

BI

1

Code: 166-62075

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT JOURNAL

KOKAI PATENT APPLICATION NO. HEI 7[1995]-165605

Technical Disclosure Section

Int. Cl.⁶:

A 61 K 38/46
A 61 J 1/06
A 61 K 9/14
A 61 K 37/54
9/14
A 61 K 47/02
47/12
47/16
47/42
//A 61 K 9/08
(A 61 K 47/42
47:12
47:16
47:02)
A 61 K 9/14

Application No.:

Hei 5[1993]-316645

Application Date:

December 16, 1993

Publication Date:

June 27, 1995

No. of Claims:

2 (Total of 4 pages; OL)

Examination Request:

Not requested

VIAL WITH ACTIVATED PROTEIN C

BEST AVAILABLE COPY

Inventor:

Masao Nakagawa
Tokyo Medical University
Department of Internal
Medicine
Hirokojijouru,
Kawahara-cho,
Kumamoto-shi,
Kumamoto-ken

Applicants:

000003001
Teijin Ltd.
6-7 Minami Hon-cho
1-chome, Chuo-ku,
Osaka-shi, Osaka-fu

000173555
Institute for Chemistry
and Serum Therapy,
Incorporated.
6868 Okubo, Kiyomizu-cho,
Kumamoto-shi,
Kumamoto-ken

Agent:

Yoshihiro Maeda

[There are no amendments to this patent.]

Application has been filed according to Article 30,
paragraph 1 of the Patent Law. Publicly disclosed on October 30,
1994 in Clinical Hematology, Vol. 34, No. 10, published by the
Japanese Assn. of Clinical Hematology.

Abstract

Objective

A vial filled with a 24-h dose of activated protein C.

Constitution

A vial containing 2000-20000 units of activated protein C.

Claims

1. A vial with activated protein C containing 2000-20,000 units of activated protein C.

2. A vial with activated protein C containing 2000-20000 units of activated protein C, 250-1000 mg human blood serum, 60-240 mg sodium citrate, 50-200 mg glycine, and 70-280 mg sodium chloride.

Detailed explanation of the invention

[0001]

Industrial application field

The present invention is concerned with a drug form for intravenous injection of activated protein C possessing anticoagulant activity.

[0002]

Prior art

Protein C is a vitamin K-dependent glycoprotein. This glycoprotein is synthesized in the liver, and circulates in blood plasma as a proenzyme at a concentration of about 4 µg/mL. Protein C is converted by thrombin-thrombomodulin complex on vascular endothelium into active serine protease, in other words, activated protein C (hereinafter abbreviated APC). Because APC carries out limited hydrolysis of the proteins of both factor Va, which is a cofactor of prothrombin activation (thrombin production) induced by Factor Xa, and factor VIIa, which is a cofactor of factor X activation induced by factor IXa, it possesses anticoagulant effects.

[0003]

Because APC suppresses the tPA-inhibiting activity of tPA inhibitors by binding with the corresponding tPA inhibitor, it also possesses fibrinogenolysis-promoting activity.

[0004]

Problems to be solved by the invention

The authors of the present invention have conducted investigations into injection of protein C in an activated form, in other words, APC, for the treatment of several types of thrombosis, as well as in-depth studies to determine the drug

form, in which a 24-h dose is contained in a single ampule so as to be able to perform injections in a simple operation.

[0005]

Means to solve the problems

The present invention consists of:

1. A vial with activated protein C containing 2000-20000 units of activated protein C, and
2. A vial with activated protein C containing 2000-20000 units of activated protein C, 100-1000 mg human blood serum, 24-240 mg sodium citrate, 20-200 mg glycine, and 28-280 mg sodium chloride.

[0006]

The activated protein C used in the present invention is well-known in the technical field. This may be a protein obtained in vitro by activating protein C (hereinafter abbreviated as PC) from blood or prepared by a genetic recombination technique with thrombin or thrombin-thrombomodulin complex, or a protein obtained by direct expression as APC using a genetic recombination technique.

[0007]

A unit of such APC is defined as the amount that doubles the activated [partial] thromboplastin time (APTT) of normal human blood plasma, and is specifically measured in the manner described below.

[0008]

The APC activity measurement method consists of measuring the APTT (seconds) of a diluted sample by adding normal human blood plasma, and using the dilution ratio obtained at the moment when this value is two times the value of the control (buffer solution) as the value of APC activity of the sample.

[0009]

Procedure

A sample is diluted with a buffer solution of 1% HSA and Veronal (for example, 400, 500, 800, 1000 times). 100 μ L of normal human blood plasma (for example, cytolog [transliteration]) and 100 μ L of APTT reagent (for example, actin) are added at an interval of 15 sec and mixed with 100 μ L of diluted solutions of samples or control (buffer solution) at 37°C, and 100 μ L of 0.025M CaCl_2 are added 2 h later, measuring the coagulation time.

[0010]

Calculation of activity

The APTT values (Y) obtained at the dilution ratios (X) of the control and samples are used to obtain an equation of linear regression of Y a coefficient of correlation dependent on $10^3/X$.

[0011]

$Y = A(10^3/X) + B$, and,

if the doubled value of the APTT (in seconds) of the control is designated as Y_1 , then the APC activity of the samples (unit: mL) is the value of X_1 obtained from:

$$X_1 = 10^3 \{ (Y_1 - B) / A \}.$$

[0012]

Vials used for drip and regular intravenous injections in medical facilities, for example, those recorded in the Japanese Pharmacopoeia, can be used as the vials for storage of 2000-20000 units of such activated protein C.

[0013]

Although APC may be contained in such vials in a pure form, usually it is mixed with various stabilizers in order to stabilize APC. ~~Proteins and various salts~~, as well as amino acids used alone or in combination are representative of such stabilizers, with the proteins selected from albumin, immunoglobulin, salts selected from sodium chloride, citrates, and phosphates. Glycine, lysine, and alanine are suggested as the amino acids.

[0014]

Among such combinations, combinations of sodium chloride, glycine, sodium citrate, and human blood serum albumin are particularly suitable.

[0015]

When the vial with activated protein C of the present invention is used for intravenous injections and drip, 4-40 cc of physiological saline or purified water for injection are added per vial of the present invention, and if necessary for intravenous drip, it may be further dissolved in 200-1,000 cc of water used for intravenous drip. Because a single vial of the present invention constitutes a 24-h dose, there is no need to mix the contents of several vials or to divide the contents of single vials into multiple portions. For this reason, because there can be no dosage errors, and because no painstaking mixing and division operations are required, it can be used in a simple and easy manner in a medical facility.

[0016]

Below, the present invention is explained in greater detail by referring to application examples.

[0017]

Application Example 1

Method of APC preparation

As an example of a method for the preparation of APC used in the present invention, a method is shown below in which APC is obtained by activating PC prepared from normal human blood plasma with thrombin. Namely, protein C (PC) is isolated by subjecting normal human fresh frozen plasma to affinity chromatography using monoclonal antibodies recognizing the G_a-domain. It is activated with thrombin, subjected to chromatographic refining using an anion-exchange substance, and then, upon dialysis treatment, to filtration, and freeze-drying. See specific examples in the application "Human activated protein C preparations and preparative method therefor" (Japanese Patent Application No. Hei 5[1993]-292499) filed by the authors of the present application on October 29, 1993.

[0018]

An APC preparation of the composition shown below is prepared by adding a stabilizer to the thus-obtained APC. See specific examples of the preparative method in the application "Method of stabilization and stabilizing composition for protein C or activated protein C" (Japanese Patent Application No. Hei 05[1993]-292500) filed by the authors of the present application on October 29, 1993.

[0019]

Table I

Activated protein C (APC)	500 units
Human blood serum albumin	25 mg
Sodium citrate	6 mg
Glycine	5 mg
Sodium chloride	7 mg

[0020]

The product is sealed in vials in an amount of 2000-20,000 units of APC.

[0021]

Application Example 2Experiment for determining units of administration

48 patients with leukemia accompanied by DIC were divided into 3 groups, administered, respectively, 50 units, 150 units and 300 units/kg-day APC every day and checking their overall improvement and general stability. The overall improvement was optimum at 300 units/kg-day, and there were no problems with general stability either.

[0022]

Dosages from 150-300 units/kg-day can be used in the future.

[0023]

It is preferable to prepare a series of vials containing from 1500-21,000 units/vial, and preferably, from 2000-20,000 units/vial as a 24-h dose per 10-70 kg of body weight of children and adults.

[0024]

Application Example 3

A 23-year-old female patient Y.I. (weight: 50 kg) with acute lymphocytic leukemia as the basic disease was diagnosed with disseminated intravascular coagulation (DIC), with a DIC score of 4 points. The patient was subjected to intravenous drip with APC in the amount of 300 units/kg/day for 6 days using vials containing 15,000 units of APC each. The DIC score on the last day of drip was 2 points, with a medium improvement based on the DIC score. Also, improvement based on FM testing was considered a conspicuous improvement. Based on this, the global evaluation was that the treatment was efficient with respect to DIC, there were no side effects, and the administration was extremely useful.

[0025]

Application Example 4

The patient was a 72-year-old male. He had been under observation for protein C (PC) deficiency syndrome, high blood

pressure, and abdominal aneurysm since Heisei X₁^{*}. An increase in the aneurysm was observed since March Heisei X₂, and he was admitted to the hospital for thorough examination and treatment. A fusiform aneurysm accompanied by thrombosis extending from right below the renal artery to the common iliac vein furcation region was found, and from the coagulopathic standpoint, there was concern that DIC could be also present. PC activity was 48%, and the amount of antigen dropped as low as 35%, while the second son of the patient was also diagnosed with type I PC deficiency with similar low PC activity and amount of antigens. While controlling DIC with heparin in an amount of 10,000 units/day and Chiguropijin [transliteration] in an amount of 200 units/24 h, during angiography conducted before the operation and during the operation, the patient was given a continuous drip infusion of an activated PC preparation (CTC-111) in the amount of 200 units/kg/24 h, which allowed performance of an aneurysm excision operation safely without thrombosis. An improvement in DIC was observed 10 days after the operation. Supplementation with the activated PC preparation during the operation to remove an abdominal aneurysm accompanied by serious DIC in a patient with a PC deficiency as a basic disease proved successful.

* Translator's note: since 1989 or later

BI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-165605

(43) 公開日 平成7年(1995)6月27日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/46	ACB			
A 6 1 J 1/06		H		
A 6 1 K 9/14				
		A 6 1 K 37/ 54	ACB	
		9/ 14	L	
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 4 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平5-316645

(22) 出願日 平成5年(1993)12月16日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年10月30日
日本臨床血液学会発行の「臨床血液 第34巻 第10号」
に発表

(71) 出願人 000003001

帝人株式会社

大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

(71) 出願人 000173555

財団法人化学及血清療法研究所

熊本県熊本市清水町大窪668番地

(72) 発明者 中川 雅夫

京都市上京区河原町広小路上ル 京都府立
医科大学第二内科学教室内

(74) 代理人 弁理士 前田 純博

(54) 【発明の名称】 活性化プロテインCバイアル

(57) 【要約】

【目的】 活性化プロテインCの1日当り投与量が入ったバイアル。

【構成】 活性化プロテインCを2,000~20,000単位含有するバイアル。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 活性化プロテインCを2,000~20,000単位含有する活性化プロテインCバイアル。

【請求項2】 活性化プロテインC 2,000~20,000単位、人血清アルブミン250~1,000mg、クエン酸ナトリウム60~240mg、グリシン50~200mg及び塩化ナトリウム70~280mgを含有する活性化プロテインCバイアル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗凝固活性を有する活性化プロテインCの静脈注入用の薬剤形態に関する。

【0002】

【従来の技術】プロテインCはビタミンK依存性の糖蛋白質であり、この糖蛋白質は肝臓で合成され、血漿中で酵素前駆体として約4μg/mlの濃度で循環している。プロテインCは血管内皮上のトロンビン-トロンボモジュリン複合体によって活性化セリンプロテアーゼ、即ち、活性化プロテインC（以下APCと略記することあり）に変換される。APCは因子Xaが誘導するプロトロンビン活性化（トロンビン生成）の補因子である因子Va、ならびに因子IXaが誘導する因子X活性化の補因子である因子VIIIaの両方の蛋白を限定加水分解するので抗凝固効果を有する。

【0003】またAPCはtPAインヒビターと結合して当該インヒビターのtPA阻害活性を抑制するため線溶促進活性をも有する。

【0004】

【発明が解決すべき課題】本発明者らは、いくつかの血栓症に対して活性化された形態のプロテインC、即ちAPCを投与することを検討し、しかも投与に際し簡便な操作で実施できるために1日当りの投与量が1バイアルに収容された薬剤形態を見出すべく鋭意研究した。

【0005】

【課題を解決する手段】本発明は、

1. 活性化プロテインCを2,000~20,000単位含有する活性化プロテインCバイアル、であり、更には

2. 活性化プロテインC 2,000~20,000単位、人血清アルブミン100~1,000mg、クエン酸ナトリウム24~240mg、グリシン20~200mg及び塩化ナトリウム28~280mgを含有する活性化プロテインCバイアル、である。

【0006】本発明に用いる活性化プロテインC自身は当該技術分野で周知であり、血液由来又は遺伝子操作技術で調製したプロテインC（以下PCと略記することあり）をトロンビンまたはトロンビン-トロンボモジュリン複合体で *in vitro* で活性化したもの、あるいは遺伝子操作技術で直接APCとして発現させることにより得られたものを用いることができる。

【0007】かかるPCの1単位とは、正常人血漿の活性化トロンボプラスチン時間（APTT）を2倍に延長する量として定義され、具体的には以下の如く測定する。

【0008】APC活性測定法は、希釈した検体を正常人血漿に加えてAPTT（秒）を測り、その値が対照（緩衝液）の値の2倍となるときの希釈倍率を、検体のAPC活性の値とする。

【0009】<操作法>検体を1%HSA加ペロナル緩衝液で希釈する（例えば400、500、800、1000倍になるように）。37℃で、対照（緩衝液）または検体の各希釈液の各々100μlに、正常人血漿（例えばサイトロール）100μl、APTT試薬（例えばアクチン）100μlを15秒間隔で加えて混和し、2分間後、0.025M CaCl₂ 100μlを加え凝固時間を測定する。

【0010】<活性の計算>対照および検体の各希釈率（X）でのAPTTの値（Y）から、 $10^3/X$ とYの直線回帰式と相関係数を求める。

$$【0011】Y=A(10^3/X)+B$$

対照のAPTT（秒）の2倍の値をY₁として、

$$X_1=10^3\{(Y_1-B)/A\}$$

から求めたX₁の値を、検体のAPC活性（単位/ml）とする。

【0012】かかる活性化プロテインCを2,000~20,000単位含有させるために用いるバイアルとしては、医療現場において通常静脈注射や点滴において用いられるバイアルを用いることができ、例えば日本薬局方に記載されているものである。

【0013】かかるバイアル中にはAPC単独で存在することもできるが通常はAPCを安定化するために種々の安定化剤を共存させる。そのような安定化剤としては蛋白と各種塩類又はアミノ酸類の単独あるいは混合物が代表的なものであり、蛋白としてはアルブミン、免疫グロブリン、塩類としては塩化ナトリウム、クエン酸塩、リン酸塩からなる群から選択されるものである。アミノ酸類としては、グリシン、リジン、アラニンが挙げられる。

【0014】かかる組合せの中でも、特に人血清アルブミン、クエン酸ナトリウム、グリシン及び塩化ナトリウムの組合せが好適である。

【0015】本発明の活性化プロテインCバイアルを用いて静脈注射又は点滴に用いる場合、本発明のバイアル1本に対して、生理食塩水又は注射用精製水4~40ccを添加し、要すればそれを更に200~1000ccの点滴用水に溶かして点滴に供すればよい。本発明のバイアルは1本で1日の投与量となっているため、複数本を混合したり、又は複数に分割する必要がない。それ故、投与量を間違えることなく、また混合や分割の面倒な操作がないので医療現場において簡便に用いることが

できる。

【0016】以下、実施例において本発明を更に詳細に説明する。

【0017】

【実施例1】

APCの製造方法

本発明に用いられるAPCの製造方法の1例として、正常人血漿から精製されたPCをトロンビンで活性化してAPCを得る方法を示す。即ち、正常人新鮮凍結血漿を、G1aドメインを認識するモノクローナル抗体を用いたアフィニティークロマトにかけて、プロテインC(PC)を得る。これをトロンビンで活性化し、陰イオン交換体を用いたクロマト精製にかけ、さらに透析処理して、濾過し、凍結乾燥する。具体例としては本出願人の平成5年10月29日付出願「ヒト活性化プロテインC調製物及びその製法」(特願平5-292499号)を参照。

【0018】かくして得られたAPCに安定化剤を加えて、以下の如き組成のAPC製剤とする。製法の具体例としては本出願人の平成5年10月29日付出願「プロテインCもしくは活性化プロテインCの安定化方法及び安定化組成物」(特願平5-292500号)を参照。

【0019】

【表1】

活性化プロテインC (APC)	500単位
人血清アルブミン	25mg
クエン酸ナトリウム	6mg
グリシン	5mg
塩化ナトリウム	7mg

【0020】これをAPC2,000~20,000単位になるようにバイアルに詰める。

【0021】

【実施例2】

投与単位を決める実験

DICを併発している白血病患者48人を3群に分け、APCを50単位、150単位及び300単位/kg・日で連日投与し、DICの全般改善度と概括安全度を調べた。全般改善度は300単位/kg・日が最善であ

り、かつ概括安全度もなかった。

【0022】これから150~300単位/kg・日が採用できる。

【0023】子供から大人の体重を10~70kgと考えて、1日投与量としては1,500~21,000単位/バイアル、好ましくは2,000~20,000単位/バイアルの範囲のバイアルをシリーズで用意しておくのが好ましい。

【0024】

【実施例3】急性リンパ性白血病を基礎疾患とする年令23才、体重50kgの女性患者Y. I. は汎発性血管内血液凝固症候群(DIC)と診断され、そのDICスコアは4点であった。この患者に15,000単位のAPCを含有するバイアルを用いて300単位/kg/日で6日間APCを点滴静注した。投与終了日のDICスコアは2点でありDICスコアによる改善度は中等度改善であった。またFMテスト等による改善度は著明改善、凝血学的改善度は著明改善であった。これより、総合的判断はDICに対し有効であり、副作用もなくて、本投与がきわめて有用であることが認められた。

【0025】

【実施例4】症例は72才、男性。平成X₁年よりProtein C(PC)欠損症、高血圧症及び腹部大動脈瘤にて経過観察中、平成X₂年3月動脈瘤の増大を認め、精査加療目的にて入院した。腎動脈直下より総腸骨動脈分岐部に及ぶ血栓形成を伴う紡錘型動脈瘤を認め、凝血学的にはDICの併発が疑われた。PC活性48%、抗原量35%と著明に低下、患者の次男も同様にPC活性、抗原量ともに低下しており、I型のPC欠損症と診断された。ヘパリン10,000U/日、塩酸チクロピジン200mg/日にてDICをコントロールしつつ、術前血管造影時及び手術時に、活性型PC製剤(CTC-111)を200U/kg/24hrをそれぞれ6日間の持続点滴静注し、血栓症等の合併症なく無事に動脈瘤切除術を施行し得た。術後10日目にはDICの改善も認めた。PC欠損症を基礎疾患に重篤なDICを合併した腹部大動脈瘤の手術に際し活性型PC製剤の補充が有効であった。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

A61K 47/02

J

47/12

J

47/16

J

47/42

J

// A61K 9/08

G

(A61K 47/42

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKewed/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)